

## PRODUCTION OF CYTIDINE BY FERMENTATION

Patent Number: JP3228689  
Publication date: 1991-10-09  
Inventor(s): FURUYA KAORU  
Applicant(s):: ASAHI CHEM IND CO LTD  
Requested Patent:  JP3228689  
Application Number: JP19900025574 19900205  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12P19/38  
EC Classification:  
Equivalents: JP2938497B2

### Abstract

**PURPOSE:** To enable mass-production of cytidine by transforming a specific microorganism with a recombinant DNA containing a cytidine triphosphate synthetase(CTP synthetase) gene and culturing the transformant.

**CONSTITUTION:** *Bacillus natto* C-1 strain (A) capable of producing cytidine and having the following bacteriological properties is separated from soil. The shape and size of the cell, bacillus, (0.7-1.0)X(2-8)  $\mu$ m; Gram-positive; reducing nitric acid salt; hydrolyzing starch; etc. The cell of the strain A is extracted and cloned to obtain a CTP synthetase gene (B). The component B is introduced into a vector and the strain A is transformed with the resultant recombinant DNA (C) (e.g. plasmid pFS037) to obtain a recombinant (D). Cytidine is produced by inoculating the strain D on a medium containing glucose, tetracycline, etc., and culturing at about 37 deg.C for about 3 days.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

② 日本国特許庁 (JP) ① 特許出願公開  
 ② 公開特許公報 (A) 平3-228689

③ Int. CL <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	④ 公開 平成3年(1991)10月9日
C 12 P 19/38		8214-4B	
// C 12 N 1/21		7236-4B	
15/32			
(C 12 P 19/38		8717-4B C 12 N 15/00	A
C 12 R 1/07)		審査請求 未請求 求項の数 1 (全8頁)	

⑤ 発明の名称 発酵法によるシチジンの製造方法

⑥ 特願 平2-25574  
 ⑦ 出願 平2(1990)2月5日

⑧ 発明者 古家 加夫留 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内  
 ⑨ 出願人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号  
 ⑩ 代理人 弁理士 萩上 豊規

明細書

1. 発明の名称

発酵法によるシチジンの製造方法

2. 特許請求の範囲

シチジン生産能を有する微生物を CTP シンセターゼ遺伝子を含む組換え DNA で形質転換し、得られる形質転換体を培養して培養液中にシチジンを生成蓄積させ、該培養液からシチジンを採取することを特徴とするシチジンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシチジンの発酵法による製造方法に関する。より詳しくは、本発明は、シチジン生産能を有する微生物の形質転換体を使用するシチジンの大量生産方法に関する。

【従来技術】

微生物を培養してシチジンを得る方法としては、バチルス・ズブチリス又はプロテウス・レトゲリーの変異株を用いる方法 (特公昭36-21499

号公報) ; プレビバクテリウム属のプリン、ビリミジン及びヒスチジンに対してアノログ耐性の変異株を用いる方法 (特公昭57-18671号公報) ; ミクロバクテリウム属のプリンに対してアノログ耐性の変異株を用いる方法 (特公昭57-18672号公報) ; バチルス属のビリミジンに対してアノログ耐性の変異株を用いる方法 (特公昭61-135597号公報) 等が知られている。

ところで微生物体内におけるシチジンが合成されるに至る代謝経路においては、ウリジン系化合物のウラシル基部分がアミノ化されてシチジン系化合物が生成され、該シチジン系化合物からシチジンがもたらされる。この際の反応は、ウリジン三リン酸 (以下、UTP という。) のアミノ化によりシチジン三リン酸 (以下、CTP という。) が生じる反応が唯一の経路である。この反応を触媒する酵素はシチジン三リン酸合成酵素 (以下、CTP シンセターゼという。) であるが、この酵素は生産物である CTP によるフィードバック阻害をうけること、発現量が倍地のシチ

シン量で抑制されること等、その活性は確実に調節されている。また、この酵素の遺伝子のクローニングについて、太陽酵母由来の CTPシンセターゼ遺伝子 [Journal of Biological Chemistry 261, 5568 (1986)]、バチルス・ズブチリス由来の CTPシンセターゼ遺伝子 (Journal of Bacteriology 170, 4194-4203 (1988)) の報告がある。

しかしながら、上記クローニングの報告はいずれも CTPシンセターゼ遺伝子の産業上の利用を目的としたものではなく、同酵素遺伝子を微生物を用いて高度に発現させたりしたものでもなく、且つまたそれを利用してシチジンの工業的生産を実験したものでもない。

#### (発明の目的)

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシチジンの発酵法により多量生産できる方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、ランダムな変異にのみ藉っていた従来のシチジン生産菌に代えて、組換え手法により得られた高シチジン生産能を有するシ

チジン生産菌を使用してシチジンの発酵法による多量生産方法を提供することにある。

#### 【発明の構成・効果】

本発明者は、シチジン系化合物の合成系の各種酵素群の中でも特に CTPシンセターゼに着目し、この酵素活性を強化することがシチジン生産量の上昇に寄与すると考え、クローニングした CTPシンセターゼ遺伝子をシチジン生産菌に組み込み高度に発現させることによって、 CTPシンセターゼの発現量が増加し、さらにシチジンの生産量が飛躍的に増加することを見い出し、該知見に基づき本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、シチジン生産能を有する微生物を CTPシンセターゼ遺伝子を含む組換え DNAで形質転換し、得られる形質転換体を培養して培養物中にシチジンを生成蓄積させ、該培養物からシチジンを採取することを特徴とするシチジンの製造方法にある。

本発明において使用するシチジン生産能を有する微生物としては、元来シチジン生産能を有して

いる微生物でもよいし、天然或いは人工の変異によって、シチジン生産能が付与された微生物でもよい。このような微生物としては、バチルス・ズブチリス或いはプロテウス・レトグリーの変異株、プレビバクテリウム属細胞から誘導されたプリンアナログ、ヒリミジンアナログまたはヒスチジンアナログ耐性株、ミクロバクテリウム属細胞から誘導されたプリンアナログ耐性株、バチルス・ナットウ C-1 株 (株工研発育第 1055 号) 等が挙げられる。

上記のバチルス・ナットウ C-1 は、土壤から厳しく分離されたシチジン生産能を有する菌であり、その菌学的性状は下記の通りである。

#### (a) 形態学的性状

- 1) 細胞の形および大きさ：短球菌、0.7~1.0 × 2~8 μ
- 2) 多形性：單一まれに二連
- 3) 運動性：なし
- 4) 胞子：卵型の内生胞子を栄養細胞の中央付近に生じる

#### 5) グラム染色：陽性

#### 6) 抗酸性：陰性

#### (b) 生育状況

##### 1) 肉汁寒天培養：灰白色で周辺が裂開状の扁平なコロニーを作る

##### 2) 肉汁液体培養：表面に沈殿を作るが、他は通ず

#### (c) 生理的性質

##### 1) 硝酸塩の還元：有り

##### 2) クエン酸の利用：有り

##### 3) プロビオニ酸の利用：なし

##### 4) VP テスト：陽性

##### 5) テンブンの加水分解：有り

##### 6) カゼインの加水分解：有り

##### 7) オキシダーゼ：陽性

##### 8) カタラーゼ：有り

##### 9) インドールの生成：なし

##### 10) 酸素に対する態度：好気性

##### 11) ピオチン要求性：有り

##### 12) 1.5 %グルタミン酸を含む培地で粘性物質の

生成：有り

(1) シチジンの培地への排出：有り

なお、このバチルス・ナットウC-1は、平成元年10月19日付で、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微生物等第11055号(FERM P-11055)の寄託番号で寄託してある。

シチジンを生産する能力のある微生物よりCTPシンセターゼ遺伝子をクローニングする方法としては以下の方法を用いて取得することができる。

(1) シチジン生産能を有する微生物の遺伝子を発現させることができて且つCTPシンセターゼが欠損した微生物に、シチジン生産能を有する微生物の全DNAライブラリーを導入し、シチジンを生産に要求しなくなることを目印にコロニーを選択し、そのコロニーよりDNAライブラリーを回収する方法。

(2) シチジン生産能を有する微生物のCTPシンセターゼを精製し、そのアミノ酸配列の一節より

を組み込む。このとき、目的遺伝子が染色体あたり複数組み込めば、CTPシンセターゼ遺伝子をそのまま組み込んでも良い。

CTPシンセターゼ遺伝子の改良としては、酵素は培地中のシチジンによって抑制をうけることから、遺伝子プロモーターを構成的な（いつも発現している）ものに置換すること、或いは同酵素はCTPによるフィードバック阻害をうけることから同酵素のアロステック部位をコードしている部分に変異を入れ、CTP非感受性の酵素を造成すること等が挙げられる。

このようにして得られた組換え体を含む微生物のうち、性質の安定した株を選び、通常の微生物の培養と同様の方法で培養を行なう。即ち、培地としては、炭水素、窒素源、菌の生育に必要な各種の無機塩類、アミノ酸類、ビタミン類等が適宜選択の上、それぞれ単独もしくは混合して用いられる。培地中にpHの変動が認められる場合、硫酸、炭酸カルシウム、水酸化ナトリウム、アンモニア水等を適宜添加する。また、培地中にウラシ

阻害される遺伝子のDNA配列をもつオリゴヌクレオチドと相補性を示すものを、シチジン生産能を有する微生物のDNAライブラリーより選択する方法。

(3) シチジン生産能を有する微生物の近縁の微生物のCTPシンセターゼがクローニングされている場合、これと相補性を示すものを、シチジン生産能を有する微生物のDNAライブラリーより選択する方法。

このようにして得たCTPシンセターゼ遺伝子をそのまま、或いは改良を加えた後、シチジン生産能を有する微生物中で高発現させる。その方法としては、以下の方法を用いることができる。

(1) 宿主-ベクター系の確立した微生物では、CTPシンセターゼ遺伝子をこのベクターに組み込む。このとき、このベクターが高いコピー数を持っていれば、同遺伝子をそのまま組み込んでも良い。

(2) 染色体に目的遺伝子を組み込む方法が確立した微生物では、染色体に直接CTPシンセターゼ

ル、クリジン、UMP等の化合物を多量に入れ、これをシチジンにサルベージ合成させる方法も有効である。培養温度は、20°C-48°Cの範囲において、使用する微生物の成育、シチジンの蓄積量、副産物の抑制を考慮に入れ、適宜選択できる。培養時間としては、シチジンの蓄積量、副産物の生成量によって異なるが、通常1日～7日である。

培養物からシチジンを分離採取する方法は、沈殿法、イオン交換樹脂による処理、或いは相溶による抽出等の公知の方法を用いることができる（特開昭61-135597号公報参照）。

#### 実施例

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。

#### 実施例1

##### (工程1)

バチルス・ナットウC-1株【微生物等第11055号】からの全DNAの抽出。

ショ糖濃度勾配法のわりに10%PEG沈殿法を用いる以外は洞村らの方法【微生物遺伝学

文献法、106頁共立出版社)によってバチルス・ナットウC-1株の菌体7gより3.13kgの全DNAを抽出精製した。

## 【工程2】

## 全DNAライブラリーの作製

工程1で得た全DNAに、制限酵素Pst Iを作用させ完全分解後、1%アガロースゲル電気泳動に供し、6~9kbの大きさに相当するゲル部分より、電気溶出法によりDNA断片を回収した。この回収DNA 2μgと、Pst Iで完全に開裂させた600ngのベクターPUC18を混合し、T4-DNAリガーゼで15°C、12時間反応させ、両DNAを結合させた。

この組換え体DNAをCaC2+を用いた形質転換法(モレミュラー・クローニング、349頁、ゴールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ)により、エシュリヒア・コリJB66(微生物菌種第8900号)に導入し、アンビシリン50μg/mlを含むレバロス寒天培地[バクトトリプトン(ディフコ社製)1%、酵母エキス0.5%、NaCl0.5%、寒天1.5%]上で生育してきた6800コロニーを4等分し集め、バーンボイムらの方法(Nucleic acid Research, 7, 1913(1979))によりプラスミドDNAを調製し、バチルス・ナットウC-1の染色体ライブラリーとした。

0.5%、寒天1.5%上で生育してきた6800コロニーを4等分し集め、バーンボイムらの方法(Nucleic acid Research, 7, 1913(1979))によりプラスミドDNAを調製し、バチルス・ナットウC-1の染色体ライブラリーとした。

## 【工程3】

## DNAライブラリーからCTPシンセターゼ・クローンの選択・分離

工程2で得た染色体ライブラリー-DNAをCaC2+を用いた形質転換法により、CTPシンセターゼを欠損したエシュリヒア・コリJF618(CGSC5566株:米国イエール大学、E.Coli genetic stock center)に導入し、アンビシリン80μg/mlを含み、シチジンを含まないM9培地(Na2HPO4 6g/l、KH2PO4 3g/l、NaCl 0.5g/l、NH4Cl 1g/l、2mM MgSO4、0.1mM CaCl2、200μg/mlスレオニン、30μg/mlロイシン、50μg/mlプロリン、20μg/mlヒスチジン、20μg/mlアルギニン、212μg/mlチアミン、20μg/mlウラシル)で生育する株を選択し、前出の

バーンボイムらの方法により7.6kbのバチルス・ナットウ由来のDNA断片を含むプラスミドDNAを回収した。このプラスミドをBamHI及びPvu IIで切斷することにより得られるバチルス・ナットウC-1由来の3.0kbの断片をアガロースゲル電気泳動後1μg回収し、バチルス・ズブチリス及びエシュリヒア・コリ用シャトルベクターMH3COPLEX(タカラ社製)をBamHI及びSmaIで切斷した4.9kbのDNA断片200ngと混合し、T4-DNAリガーゼで15°C、12時間反応させ、両DNAを結合させた。この組換え体DNAをCaC2+を用いた形質転換法によりエシュリヒア・コリJF618に導入し、アンビシリン80μg/mlを含み、シチジンを含まないM9培地で選択することにより、目的の7.9kbを有するプラスミドを得た。

このプラスミドpFS037は、JF618のCTPシンセターゼ欠損を安定に相殺することにより、バチルス・ナットウC-1由来のこの3.0kb断片にCTPシンセターゼ遺伝子は含まれていると判明した。

## 【工程4】

## バチルス・ナットウC-1由来CTPシンセターゼ遺伝子の塩基配列決定

同3.0kbのDNA断片の配列をサンガーらの方法(Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463(1977))により決定した(第2図)。その結果、バチルス・ズブチリスのCTPシンセターゼと同一のアミノ酸をコードする部分が存在した。しかし、その塩基配列はバチルス・ズブチリスのそれとは異なりその遺伝子唯一の使用頻度は第1義に示す通りバチルス・ナットウC-1固有のものであった。また、プロモーター領域、ターミネーター領域もこの株に固有のものであった。

## 【工程5】

## バチルス・ナットウC-1由来のCTPシンセターゼ遺伝子をプローブとした染色体DNAとのサザンハイブリダイゼーション

制限酵素BamI及びAccIで切り出したバチルス・ナットウCTPシンセターゼをコードする全域を含む1.8kbのDNA断片(第2図参照)をブ

ロープ(プローブⅠ)として、バチルス・ナットウC-1の染色体を *Pst*I、*Hind*IIIで切断したDNAヒササンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、*Pst*I切断の7.6kb、*Hind*III切断の0.5kbの予想された位置にバンドを生じた。また、終上コドンの400bp下流の *Acc*I認識部位より下流の540bpのDNA断片(第2図参照)をプローブ(プローブⅡ)とした場合には *Pst*I切断の7.6kbの予想された位置にバンドを生じた。このことから今回クローニングした3.0kbの断片がバチルス・ナットウC-1由来であることが確かめられた。一方、同実験をバチルス・ズブチリス165株(米国オハイオ大学、*Bacillus Genetic stock center* IAT株)の染色体を用いて行なった。プローブⅠを用いたところ、*Hind*III切断の0.5kbの予想された位置にバンドを生じたがプローブⅡでは、*Pst*I、*Hind*III、*Eco*RIのいずれで切断したDNAにも、バンドが検出されなかった。

## (工程6)

プラスミドpFS037のバチルス・ナットウC-1

ラサイクリン20μg/mlを含む5EED液体培地(グルコース2%、NaCl 0.25%、ポリペプトン(和光純薬)1%、イースト・エキスD-3(和光純薬)1%、ビオチン100ng/ml、ウラシル100ng/ml、pH7.3)50mlに1白金耳鉢苗し、37℃18時間培養する。この培養液5mlをより集団し、2mlのホモジネートバッファー(トリス-緩衝液20mM(pH8.0)、EDTA1mM、ATP1mM、メルカブトエタノール20mM、グルタミン2mM)に懸濁後、水中、超音波処理を施し、液体ホモジネートを得る。これを等量の2×反応バッファー(トリス-緩衝液50mM(pH8.0)、NaCl 2%、UTP10mM、ATP 1mM、GTP1mM、グルタミン20mM、EDTA1mM)と混合し、37℃5分間加温後、3分間凝縮して反応を停止させる。この反応液をHPLC分析(ワットマンSAX-10-25カラム、0.4ml/min流速-2.5%アセトニトリルバッファー(pH3.3)、流速毎分1.5ml、波長291nmで検出)し、生成したCTPを定量し、1分間に1μmolのCTPを生成する活性を1unitと定義する。

への導入

エシェリヒア・コリpFS037/JF618よりバーンボイムらの方法により抽出した15μgのpFS037を山根らのプロトプラストを用いる方法(遺伝子工学、PL73、英立出版、1987年)でバチルス・ナットウC-1株に導入し、20μg/mlのテトラサイクリン耐性となったコロニーを43得た。バーンボイムらの方法で、うコロニーのプラスミドを抽出し、*Bam*Hおよび*Eco*RIで切断し、アガロースゲルで泳動パターンを見たが、いずれもpFS037と同一のパターンであった。

これら5コロニーのうちの1つを、バチルス・ナットウC-1(pFS037)として、平成2年1月29日付で、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、商工研審第11211号(FERM P-11211)の審査番号で寄託してある。

## (工程7)

pFS037を持つバチルス・ナットウC-1のCTPシンセターゼ活性

pFS037を持つバチルス・ナットウC-1をテト

ラサイクリン20μg/mlを含む5EED液体培地(グルコース2%、NaCl 0.25%、ポリペプトン(和光純薬)1%、イースト・エキスD-3(和光純薬)1%、ビオチン100ng/ml、ウラシル100ng/ml、pH7.3)50mlに1白金耳鉢苗し、37℃18時間培養する。この培養液5mlをより集団し、2mlのホモジネートバッファー(トリス-緩衝液20mM(pH8.0)、EDTA1mM、ATP1mM、メルカブトエタノール20mM、グルタミン2mM)に懸濁後、水中、超音波処理を施し、液体ホモジネートを得る。これを等量の2×反応バッファー(トリス-緩衝液50mM(pH8.0)、NaCl 2%、UTP10mM、ATP 1mM、GTP1mM、グルタミン20mM、EDTA1mM)と混合し、37℃5分間加温後、3分間凝縮して反応を停止させる。この反応液をHPLC分析(ワットマンSAX-10-25カラム、0.4ml/min流速-2.5%アセトニトリルバッファー(pH3.3)、流速毎分1.5ml、波長291nmで検出)し、生成したCTPを定量し、1分間に1μmolのCTPを生成する活性を1unitと定義する。

このようにして、約30コピーのプラスミドpHY300PLK上にCTPシンセターゼ遺伝子を組込み、バチルス・ナットウC-1に導入することにより、10倍以上のCTPシンセターゼ活性の上昇が確認された。

## (工程8)

pFS037を持つバチルス・ナットウC-1を用いたシチジン生産

pFS037を持つバチルス・ナットウC-1をテトラサイクリン20μg/mlを含む5EED液体培地で、37℃18時間培養後、テトラサイクリン20μg/mlを含むシチジン生産培地(グルコース10%、CaCO<sub>3</sub>1%、イーストエキスD-3(和光純薬)0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.8%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.4%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>0.4%、ビオチン100ng/ml、pH7.2)50mlに2

%接種し、500 ml 容器フラスコ中、37°C 3 日間増殖したところ、0.24 mg/ml のシチジンが蓄積されていることが確認された。

なお、対照として工程 I に記載のバチルス・ナットウ C-1 をテトラサイクリンを含まない以外は同じ条件で培養したところ、シチジンの蓄積量は 0.10 mg/ml であった。

#### 実施例 2

実施例 1 で得られた pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 を、培養液にウラシル 2 mg/ml を含む以外は実施例 1 の条件で培養したところ、培地中のシチジン蓄積量は 0.41 mg/ml であった。

対照としてバチルス・ナットウ C-1 をテトラサイクリンを含まないこと以外は上記と同じ条件で培養したところ、培地中のシチジン蓄積量は 0.12 mg/ml であった。

#### 実施例 1

pFS037 を持つエシュリビア・コリ JF618 の CTP シンセターゼ活性

実施例 1 で得た pFS037 を持つエシュリビア・コ

リ JF618 をアンビシリン 50 μg/ml を含む L-プロス液体培地 100 ml に 1 白金耳棒園し、37°C、16 時間培養する。この培養液 100 ml より集めし、あとはバチルス・ナットウ C-1 の例と同様に CTP シンセターゼ活性を測定する。その結果、pFS037/JF618 はホモジネートタンパク 1 mg当たり  $103 \times 10^{-3}$  units であるのに対し、pHY300pL のみを持つエシュリビア・コリ JF618 は、 $3.7 \times 10^{-3}$  units であった。このようにバチルス・ナットウ C-1 CTP シンセターゼ遺伝子は、異種生物中の高表現も可能である。

以下余白

第 1 表 (その 1)

ヌクレオチド	使用頻度	
	アラビノ	アラビノ・アラビノ
TTC-Phe	5(1.12%)	5(1.12%)
TTC-Phe	14(2.61%)	14(2.61%)
TTC-Leu	8(0.56%)	8(0.56%)
TTC-Leu	9(1.68%)	9(1.68%)
GTT-Leu	18(3.54%)	20(3.73%)
GTC-Leu	5(0.93%)	4(0.75%)
GTA-Leu	1(0.19%)	1(0.19%)
GTC-Leu	7(1.31%)	7(1.31%)
ATT-Leu	19(3.54%)	19(3.54%)
ATC-Leu	22(4.10%)	22(4.10%)
ATA-Leu	9(0.60%)	0(0.00%)
ATG-Met	10(1.87%)	10(1.87%)
GTC-Ynl	13(2.43%)	14(2.61%)
GTC-Ynl	9(1.68%)	8(1.68%)
GTA-Ynl	12(2.24%)	11(2.05%)
GTC-Ynl	11(2.05%)	11(2.05%)
TCT-Ser	7(1.31%)	7(1.31%)
TCC-Ser	3(0.56%)	3(0.56%)
TCA-Ser	1(0.19%)	0(0.00%)
TCC-Ser	0(0.00%)	0(0.00%)
GCT-Pro	0(0.00%)	8(1.49%)
GCG-Pro	0(0.00%)	0(0.00%)
GCA-Pro	4(0.75%)	4(0.75%)
GCG-Pro	11(2.05%)	11(2.05%)
AGT-Thr	2(0.37%)	2(0.37%)
AGC-Thr	3(0.56%)	2(0.37%)
AGA-Thr	20(3.73%)	20(3.73%)
AGC-Thr	7(1.31%)	7(1.31%)
GCT-Ala	7(1.31%)	7(1.31%)
GCC-Ala	1(0.19%)	1(0.19%)
GCA-Ala	0(0.00%)	0(0.00%)
GCG-Ala	13(2.43%)	13(2.43%)

第 1 表 (その 2)

ヌクレオチド	使用頻度	
	A981-アラビノ	A981-アラビノ
TAT-Tyr	6(1.12%)	6(1.12%)
TAC-Tyr	14(2.61%)	14(2.61%)
TAA-Arg	1(0.19%)	1(0.19%)
TAG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
CAT-His	3(0.56%)	3(0.56%)
CAC-His	9(1.68%)	9(1.68%)
CAA-Gln	10(1.87%)	10(1.87%)
CAG-Gln	10(1.87%)	10(1.87%)
ATR-Asn	4(0.75%)	4(0.75%)
ATC-Asn	16(3.26%)	16(3.26%)
ATA-Lys	29(5.41%)	29(5.41%)
AGG-Lys	8(1.49%)	8(1.49%)
CAT-Asp	16(2.90%)	16(2.90%)
GAC-Asp	15(2.00%)	15(2.00%)
CAA-Glu	32(5.97%)	32(5.97%)
GAG-Glu	14(2.61%)	14(2.61%)
TCT-Cys	3(0.56%)	3(0.56%)
TCC-Cys	4(0.75%)	4(0.75%)
TGA-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
TGG-Arg	3(0.56%)	3(0.56%)
CCT-Asp	6(1.12%)	6(1.12%)
CAC-Asp	12(2.43%)	12(2.43%)
CAA-Arg	1(0.19%)	1(0.19%)
CGG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
AGT-Ser	0(0.00%)	0(0.00%)
AGC-Ser	8(1.49%)	8(1.49%)
AGA-Arg	3(0.56%)	3(0.56%)
AGG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
GGT-Gly	7(1.31%)	6(1.12%)
GCG-Gly	19(3.54%)	19(3.54%)
GGA-Gly	14(2.61%)	14(2.61%)
GGG-Gly	5(0.93%)	6(1.12%)
全コドン数	536	536

## 【発明の効果の概要】

本発明によると、C T Pシンセターゼ遺伝子を含む組換えDNAで変異転換された微生物を用いることによって、シチジンの生産性が顕著に上昇する。また、培養液中にウラシル系化合物を入れた場合、ビリミジンサルベージ系路により、シチジン系化合物の蓄積量がさらに増加する。

## 4. 図面の簡単な説明

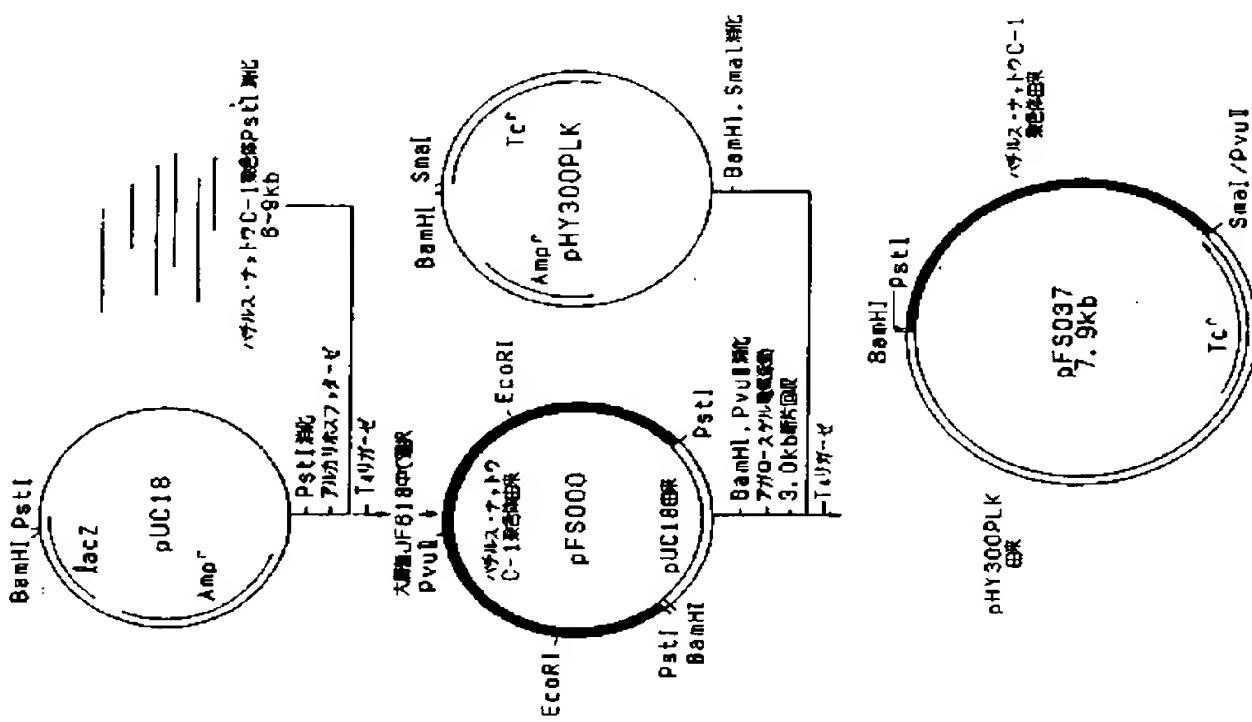
第1図は、バチルス・ナットウC-1由来のC T Pシンセターゼ遺伝子を含むプラスミドpFS 037構造の概略図である。

第2図は、バチルス・ナットウC-1由来のC T Pシンセターゼ遺伝子の塩基配列を示す。

特許出願人 加化成工業株式会社

代理人弁理士 萩上豊

第1図



三